

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-184382

(43)Date of publication of application : 27.07.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/06
// C12N 9/99

(21)Application number : 04-021651

(71)Applicant : KYODO NYUGYO KK

(22)Date of filing : 13.01.1992

(72)Inventor : OISHI HIFUMI
KIRIHARA OSAMU
UCHIDA TOMOKO
NONOMURA KAZUHIKO

(54) PRODUCTION OF INHIBITOR OF PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITY

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject inhibitor having a specific potency by reacting a casein solution with a cysteine protease inhibitor solution under specific conditions.

CONSTITUTION: 100 μ l papain solution (480m units/ml papain activated buffer solution) is mixed with 200 μ l cysteine protease inhibitor solution dissolved in 0.1M Tris-HCl buffer solution containing 0.15M NaCl and the mixture is pre-incubated at 37° C for 20min. Further, 300 μ l of 0.5% casein solution (dissolved in 0.1M Tris-HCl buffer solution at pH7.4) is further added as a substrate thereto and the ingredient is treated with an enzyme at 37° C for 60min. 100 μ l of 50% TCA is added thereto to terminate the reaction and an enzymatic reaction product in the deproteinized reaction liquid is measured to provide the objective inhibitor of activity of proteolytic enzyme having potency in which 1 unit inhibitor activity inhibits 50% of 1 unit papain activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184382

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

F I

C12P 21/06

8214-4B

// C12N 9/99

審査請求 未請求 請求項の数1 (全4頁)

(21)出願番号 特願平4-21651

(22)出願日 平成4年(1992)1月13日

(71)出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72)発明者 大石 一二三

東京都練馬区関町日東1-27-6-303

(72)発明者 桐原 修

東京都立川市柴崎町4-11-6-101

(72)発明者 内田 智子

東京都葛飾区西亀有3-25-17

(72)発明者 野々村 一彦

埼玉県狭山市入間川1545-27

(74)代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54)【発明の名称】 蛋白分解酵素活性疎外物質の製法

(57)【要約】

【目的】 蛋白分解酵素活性疎外物質の製法に関する。

【構成】 100 μ lのパパイン溶液(480 m u n i t s / m l パパイン活性化緩衝液)と0.15 M NaClを含む0.1 M トリス-HCl 緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液200 μ lを混合し、37 $^{\circ}$ C、20分間ブレインキュベートし、その後、0.5%カゼイン溶液(0.1 M トリス-HCl 緩衝液、pH 7.4に溶解)300 μ lを基質として加え、37 $^{\circ}$ C、60分間反応させ、50% TCA を100 μ l加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビター活性1単位は1単位のパパイン活性を50%阻害する力価とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 100 μ lのパパイン溶液(480 m units/mlパパイン活性化緩衝液)と0.15 M NaClを含む0.1Mトリス-HCl緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液200 μ lを混合し、37°C、20分間ブレインキュベートし、その後、0.5%カゼイン溶液(0.1Mトリス-HCl緩衝液、pH7.4に溶解)300 μ lを基質として加え、37°C、60分間反応させ、50%TCAを100 μ l加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビター活性1単位は1単位のパパイン活性を50%阻害する力価とした蛋白分解酵素活性疎外物質の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は蛋白分解酵素活性疎外物質の製法に関する。

【0002】

【従来の技術】乳汁中には他の体液(血液等)と同様にシステイン・プロテアーゼ・インヒビター(シスタチン・ファミリーCF)が存在する。CFが牛乳のどの画分に存在するかについて、経験的にホエー画分に存在するとされ、ホエー蛋白濃縮物(WPC)がCFとして用いられてきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし発明者らがWPCからCFをアクイニティー・クロマトグラフィー法で調製しようと試みた場合、WPC中のCF活性は非常に低く、CFをホエー蛋白とするには非常に困難であると考えられた。そこで、牛乳をバターミルク、ホエー、及びカゼインの各画分に分画し、CF活性の存在画分をスクリーニングし、ホエー画分よりもバターミルク画分にCFが局在していることを見いだした。バターミルク画分に存在するCF(B-CF)と既に報告されているCFとの相同性を検討するためにB-CFを精製し、その物性、種々のシステイン・プロテアーゼ及びセリン・プロテアーゼに対する影響を検討した。

【0004】

【課題を解決するための手段】ここにおいてこの発明は、100 μ lのパパイン溶液(480 m units/mlパパイン活性化緩衝液)と0.15 M NaClを含む0.1Mトリス-HCl緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液200 μ lを混合し、37°C、20分間ブレインキュベートし、その後、0.5%カゼイン溶液(0.1Mトリス-HCl緩衝液、pH7.4に溶解)300 μ lを基質として加え、37°C、60分間反応させ、50%TCAを100 μ l加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビ

ター活性1単位は1単位のパパイン活性を50%阻害する力価とした蛋白分解酵素活性疎外物質の製法を提案するものである。

【0005】

【作用】新鮮な生乳は協同乳業(株)松本工場より入手した。バターミルク、ホエーカゼイン画分は常法により調製した。バターミルク画分はヘキサンの完全脱脂した。ホエー画分は分画分子量3,000の限外濾過により脱塩したものをホエー蛋白画分とした。カゼイン画分は α s-、 β -及び κ -カゼインに分画した。システインプロテアーゼ類(微生物由来、カテプシン及びパパイン(Type III))やセリンプロテアーゼ類(アクチナーゼASとトリプシン)はSigma社より購入した。その他試薬類はすべて特級を用いた。

【0006】

【実施例】

①脂肪球皮膜物質からCFの調製法

A. 菅野の方法に準じて新鮮な牛乳から脂肪球皮膜(MFGM)を得、0.5M NaClとツイーン20などの界面活性剤0.1%を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)に懸濁し、ポリトロン(12,000rpm, 10min)を用いて均質化した後、遠心分離(5,000rpm, 10min)により抽出液を得た。これを分画分子量30,000の限外濾過モジュールで分画し、濾過液(分子量30,000以下)を集め、分画分子量6,000~10,000の限外濾過モジュールを用いて脱塩、濃縮した。この画分を20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.1)に対して平衡化し、DEAEイオン交換樹脂に負荷した。非吸着画分を分子量6,000~10,000の限外濾過により脱塩、濃縮した。

B. A.で得たMFGMを6~8M尿素を含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.1)に溶解し、遠心分離(5,000rpm, 10min)により不溶物を除去した。DEAEイオン交換樹脂に負荷し、非吸着画分を分画分子量30,000の限外濾過モジュールを用いて分画した。濾過液をさらに分画分子量6,000~10,000の限外濾過により脱塩、濃縮した。

【0007】②バターミルクからCFの調製法

C. 新鮮なバターミルクのpHを4.5に調整し、生じた等電点沈殿物(カゼインや一部のMFGM構成蛋白質)を遠心分離(3,000rpm, 10min)により除去した。得た上清液を分画分子量6,000~10,000の限外濾過を用いて脱塩し、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.1)に対して平衡化し、DEAEイオン交換樹脂に負荷した。非吸着画分を分画分子量30,000の限外濾過で分画し、濾液を分画分子量6,000~10,000の限外濾過を用いて脱塩、濃縮した。

D. C.で得た等電点分画上清液を分画分子量30,000の限外濾過で分画し、濾液を分画分子量6,000

～10,000の限外濾過を用いて脱塩、濃縮した。

【0008】③バターミルクパウダーからCFの調整法
E. バターミルクを噴霧乾燥したバターミルクパウダーを0.5～0.7M NaClとツイーン20などの界面活性剤0.1%を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)に懸濁し、常温で30分間攪拌した。遠心分離(3,000rpm, 10min)により抽出液を得た。これをC. 及びD. に記した方法で分画した。

【0009】④ホエー蛋白質画分からCFの調整法

F. チーズ又はpH 4.5の等電点分画で得たホエー蛋白質画分を、分画分子量6,000～10,000の限外濾過を用いて脱塩、濃縮し、C. 及びD. に記載の方法で調製した。

牛乳及びMFGM中のCF活性の分布を表1-Aと1-Bに、記載した方法で得たCFの比活性と回収率を表2に示した。また本記載法にて得たCFの分子量及び他のプロテアーゼ類に対する影響の結果を表3～5に示した。

表1-A. 牛乳中のシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性の分布

画分	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性 (%)
全乳	100
α S-カゼイン	0
β -カゼイン	0
κ -カゼイン	0
バターミルク	70
ホエー蛋白質	30

表1-B. 各バターミルク画分のシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性

画分	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性 (units/mg)
SU-1*	11.91
SU-2*	15.60
SU-3*	13.16
SU-4*	8.17
SU-5*	4.28
SU-6*	1.83
SU-7*	0

*: SU-1～7はバターミルクを8M尿素に溶解し、可溶解画分を8M尿素を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.1)で平衡化したSephacrose C 30

L 6Bカラムを用いてゲル濾過し、脱塩したものである。

表2. 各種調製法によるシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性とその回収率

調製法	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性 比活性 (units/mg)	回収率 (%) *
1-A	12.24	79.74
1-B	21.69	39.05
2-C	20.18	45.10
2-D	15.60	83.34
3-Ec	18.91	42.63
3-Ed	11.17	80.57
4-Fc	8.17	40.75
4-Fd	4.28	77.02

*: 回収率はそれぞれ調製前の原料中に含まれている全システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性を100

%として算出した。

表3. 牛乳中に存在するシステイン・プロテアーゼ・インヒビターの諸性状

分子量 (Kd) *	等電点 (pH) *	糖含量 (%) *	熱安定性
13.00	3.25	ND	96°C、 20minに安定 96°C、 60minで失活

5

6

* : SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて求めた。

* : フェノール硫酸法にて測定した。

* : 等電点電気泳動法にて求めた。

表4. 牛乳中に存在するシステイン・プロテアーゼ・インヒビターの構成アミノ酸残基

表5. 各種プロテアーゼに及ぼす影響

	ババイン	カテプシン		アクチナーゼAS		トリプシン
	A	B	C			
システイン・						
プロテアーゼ・	100	94.8	150.4	115.3	10.8	0
インヒビター活性						
(%) *						

* : 各プロテアーゼに対するシステイン・プロテアーゼ・インヒビターの活性 (%) はババインに対するインヒ

ビター活性を100%として表示した。